

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



Filip Müller

In vitro fertilizace u koní

In vitro fertilization in horses

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Andrej Šušor, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně na základě konzultací se svým školitelem a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29. 4. 2024

Filip Müller

Poděkování

Mé poděkování patří mému školiteli Ing. Andreji Šušorovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu a věcné připomínky při psaní mé bakalářské práce. Dále bych také rád poděkoval kolegovi Mgr. Michalu Dvořanovi za trpělivou konzultaci a své babičce za korekci češtiny.

Abstrakt

Reprodukční management v koňské chovatelské praxi se stále více opírá o *in vitro* fertilizaci (IVF) koňských oocytů. Tato technologie je komplexní proces zahrnující získání nezralých oocytů, jejich *in vitro* maturaci a *in vitro* oplození hřebčím spermatem. Po následné *in vitro* kultivaci je časné embryo přeneseno do synchronizované příjemkyně. Úspěšnost koňského IVF je však ovlivněna mnoha faktory, například kvalitou oocytů, kapacitací spermií nebo i základními technickými aspekty samotného procesu, který je značně odlišný od jiných savčích modelů. Cílem této bakalářské práce je zhodnocení současných poznatků o IVF koňských oocytů, identifikace klíčových faktorů ovlivňujících úspěšnost celého procesu a popis současných postupů při přípravě gamet pro IVF. Inkorporací nejnovějších přístupů v IVF technologii u koní, a jejich následnou optimalizací, bude dosaženo vyšší úspěšnosti celého procesu. Klíčovými aspekty pro zdokonalení koňského IVF je odběr gamet a následná manipulace s nimi, *in vitro* maturace oocytů, *in vitro* kapacitace spermií a následný embryonální vývoj.

Klíčová slova

fertilizace, oocyt, spermie, maturace, *in vitro*, embryo, ICSI, kůň

Abstract

Reproductive management in horse breeding increasingly relies on *in vitro* fertilization (IVF) techniques. This technology entails a complex process, including the acquisition of immature oocytes, their *in vitro* maturation, fertilization with sperm, and subsequent cultivation of the early embryo before transfer into a synchronized recipient. However, the success of equine IVF is influenced by various factors such as oocyte quality, sperm capacitation, and technical issues unique to this process, compared to other mammalian models. This bachelor's thesis aims to summarize and evaluate current knowledge on IVF of horse eggs, identify key factors influencing success, and describe current procedures for gamete preparation. By incorporating the latest IVF approaches and optimizing them, a higher success rate can be achieved. Key aspects for improving equine IVF include gamete collection and handling, *in vitro* oocyte maturation, sperm capacitation, and subsequent embryonic development.

Keywords

fertilization, oocyte, sperm, maturation, *in vitro*, embryo, ICSI, equine

Seznam zkratek

A2M	alfa-2-makroglobulin	UCLH1	Ubiquitin C-terminální hydroláza-L
BSA	bovine serum albumin	VN	vitronektin
CaI	kalciový ionofor	ZP2	<i>zona pellucida</i> protein 2
cAMP	cyklický adenosin monofosfát	ZP3	<i>zona pellucida</i> protein 3
CatSper	cation channels of sperm		
COC	oocyt-kumulus komplex		
Cp	kompaktní kumulus		
De	denudovaný oocyt		
Ex	expandovaný kumulus		
FN	fibronektin		
FBS	fetální bovinní sérum		
FSH	folitropin (folikuly stimulující hormon)		
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina		
ICSI	Intracytoplazmatická injekce spermií		
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace		
IVM	<i>in vitro</i> maturace		
IVP	<i>in vitro</i> produkce		
MII	meióza II		
OPU	ovum pick-up		
PKA	proteinkináza A		
PBS	phosphate buffered saline		
sAC	solubilní adenylyl cykláza		

Obsah

Úvod.....	1
1 Historie <i>in vitro</i> produkce koňských embryí.....	2
1.1 Historie intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI).....	2
1.2 Historie <i>in vitro</i> fertilizace (IVF).....	2
2 <i>In vitro</i> fertilizace koní	3
2.1 Příprava spermií pro <i>in vitro</i> fertilizaci	3
2.1.1 Zisk a uchování hřebčího spermatu	3
2.1.2 Kapacitace spermií.....	5
2.2 Příprava oocytů pro <i>in vitro</i> fertilizaci	9
2.2.1 Izolace oocytů	9
2.2.1.1 Izolace oocytů z odebraných ovárií post mortem	9
2.2.1.2 Izolace oocytů pomocí ovum pick-up techniky	11
2.2.2 <i>In vitro</i> maturace oocytů.....	12
2.2.2.1 Vliv kumulárních buněk na <i>in vitro</i> maturaci	14
2.3 <i>In vitro</i> fertilizace maturovaných oocytů kapacitovanými spermii	14
2.4 Kultivace oplozeného oocyta do stadia blastocysty	17
2.5 Kryoprezervace koňských embryí.....	18
2.6 Embryotransfer	19
3 Výhody a nevýhody konvenčního IVF oproti ICSI	20
Závěr.....	21
Seznam použité literatury.....	22

Úvod

20. století přineslo obrovský rozvoj biotechnologií. Mezi ně se řadí také metodiky umělého oplodnění. Patří mezi ně kontrolovaná ovariální stimulace, izolace a kultivace oocytů v laboratoři, *in vitro* fertilizace (IVF) nebo intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI), *in vitro* produkce (IVP) preimplantačních embryí a pomalé mražení nebo vitrifikace. IVP embryí savců byla hojně popsána již v průběhu 20. století, komerční rozmach těchto technik u koní však přichází až se začátkem 21. století. Zatímco u lidí se IVF stala úspěšnou léčbou neplodnosti, chovatelé hospodářských zvířat v této metodě shledávají především neskýtané možnosti ve šlechtění a rozvoji genetického fondu svého stáda.

IVF a kryoprezervace gamet totiž umožňují výměnu genetického materiálu mezi chovateli po celém světě za relativně krátkou dobu bez rizik spojených s dopravou zvířat, či šíření nemocí. Dále poskytují majitelům zvířat uchování a využití genetického materiálu i po uhynutí jedince, obzvláště pokud má uhynulý jedinec vzácný původ a chovatel potřebuje udržet jeho genotypové i fenotypové znaky ve svém stádě. IVF technologie nabízí spojení vybraného genetického materiálu v mezinárodním kontextu bez nutnosti finančně a technicky náročného fyzického kontaktu. V neposlední řadě také umožňuje reprodukci jedinců mnoho let po jejich smrti.

IVF byla několikrát popsána i u koní, avšak stále naráží na problematickou kapacitaci spermií *in vitro*, neschopnost spermií penetrovat *zonu pellucidu* (ZP) a na nízkou úspěšnost *in vitro* kultivace oplozeného oocyty do stadia blastocysty. Nejednoznačné a nekonzistentní výsledky výzkumu těchto překážek doposud neumožnily využití klasického IVF v širší klinické praxi u koní.

Tato práce má za cíl zmapovat současnou situaci na poli IVF u koní, která by nahradila dosavadní komerčně využívanou metodu ICSI a stala by se tak levnější variantou IVP koňských embryí. Dále má práce nastínit směry, kterým by se výzkum IVF u koní mohl ubírat, aby bylo dosaženo přesvědčivých a konzistentnějších výsledků, jako tomu je například u skotu.

1 Historie *in vitro* produkce koňských embryí

1.1 Historie intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI)

ICSI je jednou z metod IVP embryí. Při této metodě dochází ke vpichu pouze jedné imobilizované spermie do zralého oocyty, čímž se obejde kapacitace spermií a přirozená fertilizace. Následná kultivace presumptivních zygot vede až v 39 % k tvorbě blastocyst (Choi et al., 2016), které mohou být určeny k transferu a následnému náhradnímu mateřství, což je u koní, využívaných zejména ve sportu, běžnou praxí.

V roce 1996 byla publikována první pokročilá březost (75. den po ovulaci) po přenosu embrya získaného pomocí techniky ICSI (Squires et al., 1996). Výsledky však byly nekonzistentní, úspěšnost zdařilé kultivace embrya do stadia blastocysty byla velmi malá z důvodu velkého poškození oocytů během vpichu kapiláry se spermií, a tudíž se tato technika nedala využít efektivně v klinické praxi. Komerčnímu využití se této technice dostalo až začátkem 21. století s použitím piezoelektrického drillu (Choi et al., 2002). Skupina kolem Dr. Choie se inspirovala Kimurou a Yanagimachim, kteří provedli ICSI na myších oocytech s použitím Piezo drillu s výsledkem 80 % oplodněných oocytů po injektování spermie s následnou 70% úspěšností vývoje embryí do stadia blastocysty (Kimura a Yanagimachi, 1995). U koňských oocytů byla dosažena 74% úspěšnost *in vitro* kultivace embrya 8-16ti buněčného stadia (Choi et al., 2002). Od té doby došlo pouze k mírným úpravám kultivačních médií a dnes je ICSI převážnou, komerčně využívanou, technikou IVP koňských embryí.

1.2 Historie *in vitro* fertilizace (IVF)

S ohledem na úspěšnost IVF u skotu a u lidí se pokusy na koňských gametách začaly provádět mnohem dříve než ICSI (Palmer et al., 1991; Bézard, 1992). Avšak pouze několik málo hříbat bylo doposud narozeno po IVF.

První úspěšná aplikace IVF, která vedla k narození živého hříběte, byla publikována v roce 1991. Z 8 zygot po IVF následně přenesených do vejcovodů náhradních matek vzešla jedna březost, která vedla k porodu živého a zdravého hříběte dne 14. 6. 1990 (Palmer et al.,

1991). Další publikace referující narozené hříbě po IVF je z roku 1992 (Bézar, 1992). V obou těchto publikacích byl použit pro *in vitro* kapacitaci spermií kalciový ionofor A23187 a zygoty po IVF byly chirurgicky přeneseny do vejcovodu náhradních matek, kde byly dále kultivovány v *in vivo* podmínkách, než došlo ke graviditě. Poté, s rozmachem ICSI, nastala dlouhá odmlka v produkci hříbat po IVF, kdy se většina pozornosti upnula na komerční provedení ICSI.

Průlom přišel až v roce 2022, kdy byl publikován první funkční protokol pro efektivní a reprodučibilní IVF u koní. Po pre-inkubaci spermií 22 hodin v kapacitačním médiu s 0,46 mM penicilaminu, 0,23 mM hypotaurinu a 0,046 mM epinefrinu (PHE roztok) a následné 3hodinové ko-inkubaci s kumulus-oocyt komplexem (angl. cumulus-oocyte complex, COC) došlo až v 90 % k oplodnění oocytů, z nichž 74 % dosáhlo stádia blastocysty (Felix et al., 2022). Ze třech blastocyst náhodně vybraných z jednotlivých experimentů v rámci studie přenesených do děloh 3 náhradních matek byly indikovány 3 březosti a následně narozena 3 zdravá hříbata. Po provedení genetických testů bylo potvrzeno, že skutečně došlo ke splynutí gamet jedinců vybraných pro tuto studii (Felix et al., 2022).

2 *In vitro* fertilizace koní

2.1 Příprava spermií pro *in vitro* fertilizaci

2.1.1 Zisk a uchování hřebčího spermatu

Pro úspěšnost IVF je, mimo jiné, zapotřebí pracovat s kvalitně odebraným, zpracovaným a správně uchovaným hřebčím spermatem. V této kapitole se ve stručnosti zmíním o současných technikách odběru, procesování a mražení spermatu.

Odběr semene se běžně provádí na fantomu s pomocí umělé vagíny v hygienické odběrové místnosti (Obrázek 1). Přítomnost klisny v říji u odběru urychlí erekci hřebce, na rychlost ejakulace a celkový odběrový čas to však nemá vliv (Noue et al., 2001). Hřebec si po krátkém tréninku zcela zvykne na fantom s umělou vagínou, takže přítomnost klisny včetně asistence člověka není nutná. Pro lepší výsledky odběru by měla být umělá vagina nastavena na penis odebíraného hřebce tak, aby vyvíjela správný tlak vedoucí k lepší sexuální stimulaci

hřebce. Dále by měla být naplněna teplou vodou, aby vnitřní prostředí umělé vagíny mělo teplotu 43°C, ne však vyšší než 50°C, což by způsobilo nenávratné poškození spermií (Hillman et al., 1980; Love, 1992).



Obrázek 1. Technici provádějící odběr hřebčího semene. Hřebec skočí na fantom, který simuluje klisnu, na jeho penis je nasazena umělá vagína, která je z obou stran otevřená a po ejakulaci je semeno zachyceno do sterilní nádoby překryté gázou pro filtraci gelovité složky ejakulátu. Převzato z archivu firmy ERC s.r.o.

Ejakulát musí být následně zpracován. Je nutné jej nejprve oddělit od gelovité složky, nejlépe již při ejakulaci s použitím filtru v umělé vagíně (Jasko, 1992). Přefiltrovaný ejakulát se naředí 1:1, respektive 2:1 při větší koncentraci spermií než je obvyklé, extenderem obsahujícím kasein a glukózu pro výživu spermií, lipoproteiny pro ochranu spermií před teplotním šokem a antibiotika pro prevenci kontaminace mikroorganismy (Brinsko et al., 2011). Takto naředěný ejakulát se stále velkým množstvím seminální plazmy je zkoncentrován pomocí centrifugace. Nejmenší poškození spermií s jejich největší výtěžností

je uváděno při hodnotě 600 g po dobu 10 minut (Dell'aqua et al., 2001). Alternativní metodou koncentrace spermií, která se vyhýbá centrifugaci, a tím i mechanickému poškození spermií, je filtrace ejakulátu přes syntetickou hydrofilní membránu, která zachytí spermie, ale zároveň propustí seminální plazmu. Pro tuto metodu musí být odebrané sperma zředěno 2:1 (v/v) odstředěným mlékem, či kaseinovým extenderem. Spermie jsou poté odmyty z filtru předpřipraveným objemem mrazícího extenderu. (Alvarenga et al., 2016). Získaný sediment musí být ihned odebrán a pro kryoprezervaci spermií rozpuštěn v mrazícím extenderu.

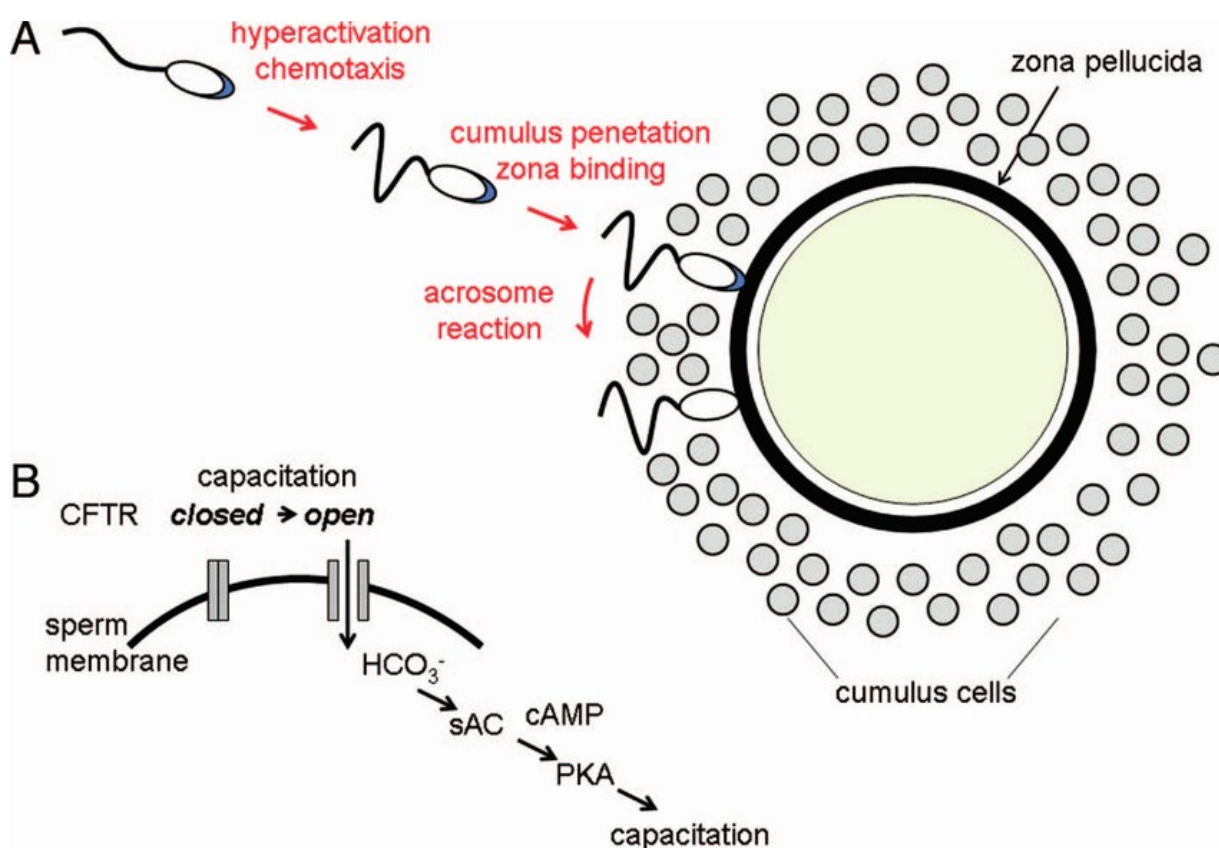
Po odstranění seminální plazmy, zkoncentrování spermií a přidání mrazícího extenderu je semeno naplněno do plastových 0,5ml pejet či 5ml tub ručně nasávací metodou, nebo pomocí přístroje na plnění pejet (například plnička MRS1 Dual v2 od společnosti IVM Technologies). Pejety jsou poté utěsněny pomocí jednou z dostupných metod, například s použitím kovových či skleněných kuliček, nejčastěji však pomocí ultrazvukové metody, která svaří plast k sobě (Alvarenga et al., 2016).

Posledním krokem je zamražení připravených pejet. Nejdéle využívanou metodou je pomalá kryoprezervace, při které se nejprve pejeta se spermatem ochladí z pokojové teploty na teplotu 5°C v průběhu 20 minut až 1 hodiny v závislosti na použitém kryoprotektantu. Poté se pejeta umístí do stojanu 4 cm nad hladinu kapalného dusíku na 15 min, a po uplynutí této doby se pejeta ponoří přímo do kapalného dusíku, ve kterém je následně uskladněna (Macedo et al., 2018). Nejmodernější technikou kryoprezervace je vitrifikace, kdy dojde k rychlému snížení teploty na -196°C během několika sekund. Suspenze spermií ve vitrifikačním médiu se po 30μl kapkách nakape přímo do kapalného dusíku z 10 cm nad jeho hladinou. Po doteku s kapalným dusíkem se ihned zformují kuličky, které plují na povrchu. Po cca 24 sekundách, ve kterých proběhne solidifikace, kuličky klesnou na dno, odkud jsou pomocí peánu přeneseny a zabaleny do 1,8ml kryotub, které zůstanou uloženy v tekutém dusíku (Hidalgo et al., 2018).

2.1.2 Kapacitace spermií

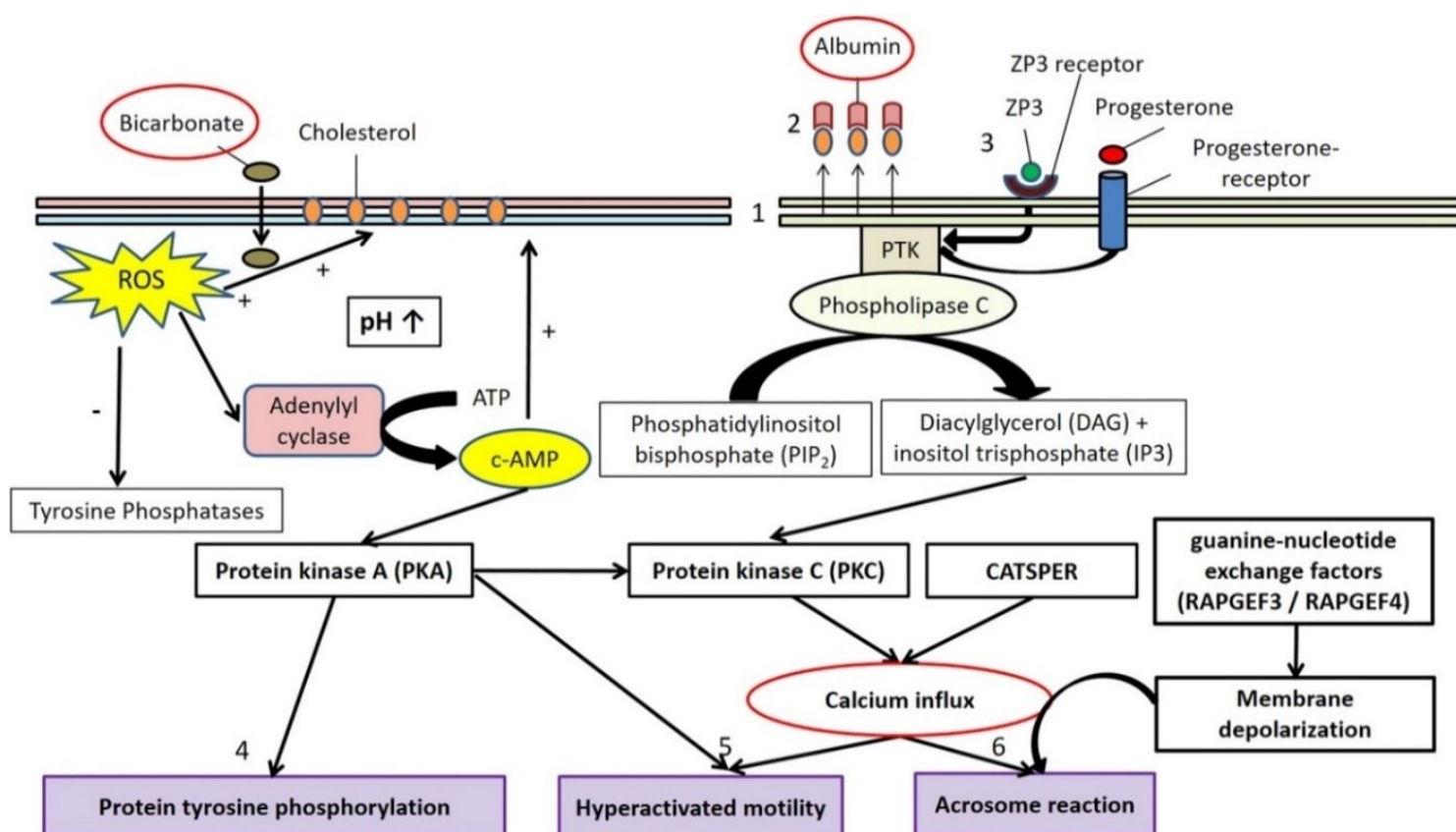
Kapacitace spermií *in vitro* je jedním ze zásadních překážek pro konvenční použití IVF u koní. Spermie neprojde v maturačních médiích aktivací, díky které by byla schopna

akrozomální reakce a následně penetrovat *zonu pellucidu*. Že je na vině nedostatečná kapacitace spermií a ne komplikace při *in vitro* maturaci (IVM) oocytů bylo nezávisle potvrzeno. Hinrichs et al. (2002) implementovali *in vitro* maturované oocyty do vejcovodu, provedli inseminaci klisny a potvrdili, že tyto IVM oocyty mohou být oplozeny *in vivo*. Naopak *in vivo* maturované oocyty v MII fázi získané z preovulačních folikulů nebyly schopné IVF po koinkubaci se spermiemi (Palmer et al., 1991). Pro úspěšnou a spolehlivou kapacitaci *in vitro* je třeba pochopit mechanismy kapacitace, ke kterým dochází *in vivo* ve vejcovodech klisen.



Obrázek 2. A) Pouze kapacitovaná spermie je schopna projít akrozomální reakcí a následně oplodnit oocyt. **B)** Ve vejcovodu samice dojde k otevření iontových kanálů, které zvýší intracelulární koncentraci HCO_3^- a s tím spojená změna pH spustí signální kaskádu vedoucí ke kapacitaci spermie. cAMP – cyklické AMP, CFTR - transmembránový regulátor vodivosti cystické fibrózy, PKA – proteinkináza A, sAC – solubilní adenyl cycláza. Převzato od Florman et al., 2007.

Spermie schopna penetrace *zony pellucidy* vykazuje vícero znaků úspěšné kapacity a aktivace, především fosforylaci tyrosinů v některých proteinech spermie, hyperaktivaci motility nebo zvýšenou fluiditu plazmatické membrány (Obrázek 2). Ke zvýšení fluidity membrány *in vitro* dojde po odstranění seminální plazmy pomocí centrifugace v hustotním gradientu, čímž se zvýší intracelulární koncentrace HCO_3^- iontů a s tím i pH v cytosolu spermie (Obrázek 2). To aktivuje systém sekundárních posílů včetně solubilní adenylyl cyklázy (sAC) a zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů (Rathi et al., 2003). Aktivace sAC vede k tvorbě cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) (Obrázek 3). cAMP hraje roli v odčerpání cholesterolu z plazmatické membrány spermie pomocí akceptoru albuminu, což vede k



Obrázek 3. Základní molekulární podstata kapacitačních dějů *in vivo*. Převzato od Leemans et al., 2019.

agregaci mikrodomén na apikální straně hlavičky spermie. Mikrodomény obsahují proteinové komplexy vážící se na proteiny *zony pellucidy* a SNAP receptor (SNARE) proteiny důležité při akrozomální reakci (van Gestel et al., 2007; Tsai et al., 2012). Dále je pomocí cAMP

aktivována proteinkináza A (PKA), která následně fosforyluje tyrosiny v proteinech spermií (Obrázek 3). U prasete byla shledána fosforylace tyrosinu v proteinech bičíku spermie jako hyperaktivátor motility, která slouží také jako jeden z markerů kapacitace spermií (Harayama et al. 2012). Do dnešní doby však nebyly nalezeny všechny spouštěče kapacitace u koní a jejich objevení je předmětem současných studií.

Mnoho studií se rozhodlo obejít přirozenou kapacitaci spermií použitím vápníkových ionoforů či různých chemických sloučenin. Palmer et al., (1991) a Bézard et al., (1992), kteří publikovali první narození hříbat po IVF, použili pro kapacitaci spermií vápníkový ionofor A23187 (Cal A23187). Jde o iontový přenašeč, který reverzibilně váže ionty vápníku a katalyzuje tak jejich přenos skrze plazmatickou membránu. Zvýšení hladiny Ca^{2+} iontů spustí uvnitř spermie cAMP/PKA kinázovou kaskádu, která fosforyluje proteiny zodpovědné za kapacitaci (Obrázek 3).

Použití Cal A23187 umožní influx Ca^{2+} iontů do spermie, které spustí akrozomální reakci a následné proniknutí spermie *zonou pellucidou* do oocyty (Yanagimachi, 1975). Na druhou stranu vápníkové ionty spermie imobilizují (Hong et al., 1985). Suarez et al., (1987) uvádějí, že imobilizované spermie jsou stále živé a po přidání vysoké koncentrace bovinního albuminového séra (BSA) se obnoví jejich motilita, protože BSA má vysokou afinitu k Cal A23187 a vápníkové ionty vychytá. U koňských spermií byl kalciový influx zastaven po přidání 33 mg/ml BSA do média s 0,66 μM Cal A23187 (Sampaio et al., 2021). Další autoři však uvádějí (Alm et al., 2001; Hinrichs et al., 2002), že úspěšnost fertilizace po inkubaci spermií s Cal A23187 je variabilní a úspěšnost oplodnění je nízká a nekonstantní (0-36%). Další alternativou pro spuštění kapacitačních procesů je použití chemických sloučenin. Vyzkoušen byl například heparin, který funguje u bovinního IVF, ale u koní nedošlo k prvnímu buněčnému dělení embrya u žádného z experimentů. K penetraci oocyty a následné tvorbě samčího prvojádra došlo maximálně v 4,6 % (Dell'aquila et al., 1996). Dále byly vyzkoušeny jako kapacitační faktory progesteron (Tremoleda et al., 2003), kofein (Mugnier et al., 2009), prokain (Ambruosi et al., 2013) či 10% ovidukální tekutina (Lange-Consiglio a Cremonesi, 2011) s podobným výsledkem jako u heparinu. Jako funkční se ukázala až pre-inkubace koňských spermií 22 hodin s PHE roztokem (viz strana 3), kdy po IVF došlo k fertilizaci v 90 % případů (Felix et al., 2022).

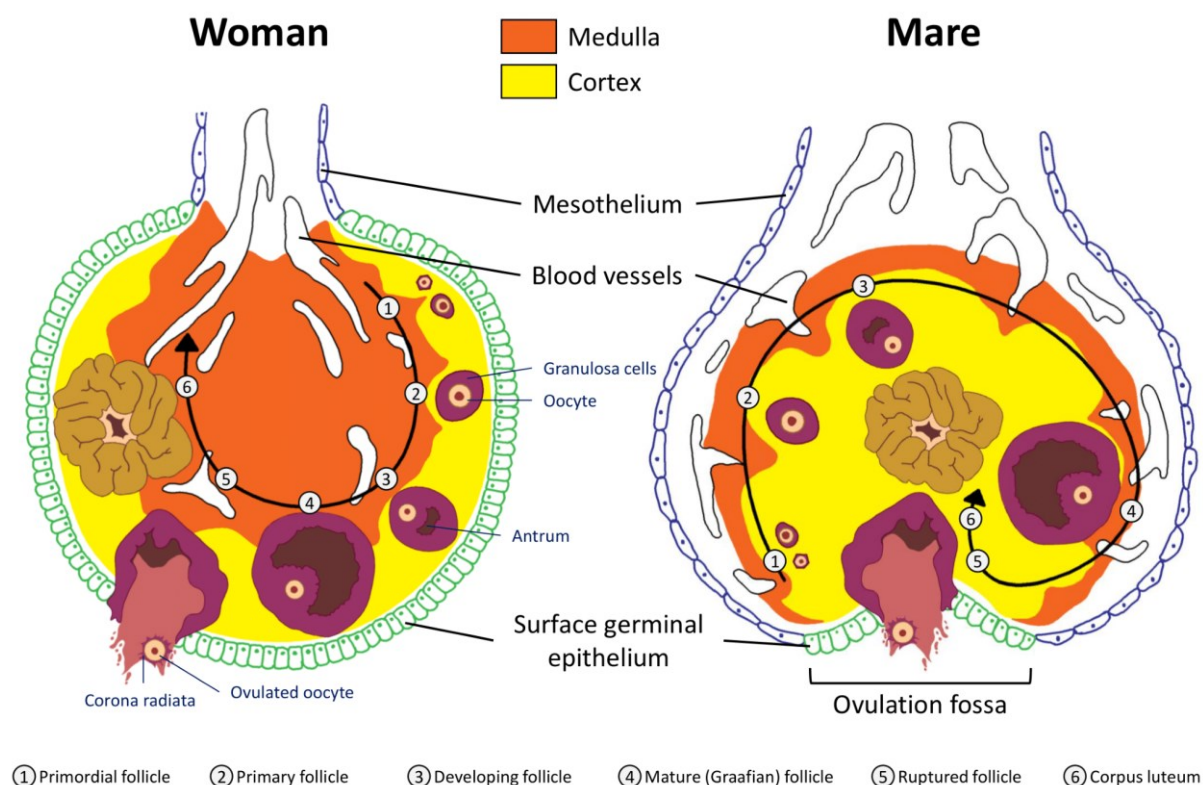
2.2 Příprava oocytů pro *in vitro* fertilizaci

2.2.1 Izolace oocytů

2.2.1.1 Izolace oocytů z odebraných ovárií *post mortem*

IVF u koní je vhodným nástrojem pro reprodukci klisen *post mortem*. Odběr ovárií je nutné provést co nejdříve po úhynu. Je však potvrzeno, že i 5-ti hodinové zpoždění vede k produkci hříbat (Carnevale et al., 2003). U oocytů izolovaných do 6-8 hodin po úhynu je větší pravděpodobnost následné produkce embrya než u oocytů izolovaných po déle než 10 hodinách od úhynu jedince (Ribeiro et al., 2008). Ovária se transportují při teplotě 37°C, pokud doba transportu do laboratoře nepřesáhne 2 hodiny. Pokud je transportní doba delší než 2 hodiny, je vhodné udržovat ovária při teplotě 15-20°C, kdy dojde ke zpomalení metabolických procesů. Pokud je přepravní doba příliš dlouhá, například transport v USA či Austrálii, je vhodnější oocyty vyizolovat na místě úhynu (pokud toto místo poskytuje pro izolaci vhodné laboratorní podmínky a zázemí) a vyizolované oocyty poslat v holding médiu (40 % M199 s Hankovými solemi s 12,5 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonovou kyselinou (HEPES), 40 % M199 s Earleovými solemi a 20 % fetálního bovinního séra (FBS) s přidavkem 25 mg/ml gentamycinu), ve kterém oocyty vydrží více než 12 hodin, aniž by to mělo vliv na jejich následnou maturaci či kultivaci embrya do stadia blastocysty po IVF (Choi et al., 2006).

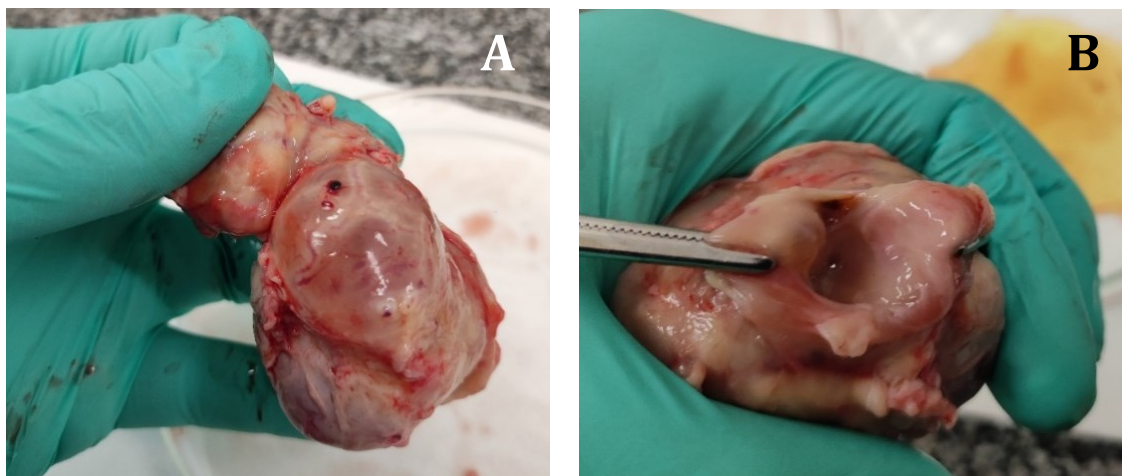
Pokud jsou získána koňská ovária, je třeba přistoupit k izolaci oocytů z folikulů za přísných laboratorních a hygienických podmínek. Čeleď koňovití (*Equidae*) se liší svou anatomickou stavbou ovárií i pozicí oocyty ve folikulu, od čehož se následná izolace oocytů odráží. Folikuly se vyskytují na povrchu ovária a liší se svou velikostí, která se pohybuje od 1 do 50 mm v závislosti na reprodukční sezoně. Preovulační folikuly vedoucí k ovulaci začínají na velikosti zhruba 35 mm a ovulují v ovulační jamce (ovulační *fossa*), což je prohlubeň specifická pro koňská ovária, ve které dochází k uvolnění zralého oocyty z folikulu do nálevky vejcovodu (Obrázek 4). Velkým rozdílem oproti jiným savcům (například člověk) je stavba ovária. U koní je na povrchu dřeň (*medulla*) a kortex, ve kterém jsou uloženy veškeré primordiální folikuly, je uvnitř (Obrázek 4).



Obrázek 4: Rozdíl mezi stavbou lidského a koňského ovária. Převzato od Bennamar et al., 2021.

Folikuly jsou proto obaleny velmi pevnou vazivovou tkání *medully*. Oocyt je s kumulárními buňkami ve folikulu propojen přes vodivé spoje (angl. gap junctions) a transzonální projekce (Baena & Terasaki, 2019) a dohromady spolu tvoří kumulus-oocyt komplexy (COCs). COCs jsou přes útvar z granulózních buněk, tzv. krček (angl. hillock), napojené na bazální membránu folikulu a granulózní buňky tvoří jeho vnitřní povrchovou výstelku (Hawley et al., 1995). Folikul je zvnějšku obalen vrstvou buněk théky, ve kterých se nacházejí cévy, které folikul zásobují živinami a přivádí hormony (Obrázek 5). Oproti bovinnímu folikulu mají koňské folikuly méně vrstev granulózních buněk mezi oocytem a bazální membránou, krček granulózních buněk je mnohem širší a projekce kumulárních buněk do vrstvy buněk théky ukotvuje pevně COC do stěny folikulu (Hawley et al., 1995). Toto histologické uspořádání znemožňuje aspiraci oocytu pouhým nasátím folikulární tekutiny injekční stříkačkou. Z toho důvodu je využívána metoda naříznutí každého viditelného folikulu pomocí skalpelu a následného seškrabávání stěny folikulu 5-9mm gynekologickou kyretou za současného

vyplachování folikulu injekční stříkačkou s holding médiem (viz strana 9) (Obrázek 5). Po zpracování všech velkých folikulů je ještě vhodné ovárium nařezat na cca 5mm plátky a zpracovat i menší folikuly, které předtím nebyly viditelné. Tento postup izolace oocytů je sice časově mnohem náročnější oproti klasické aspiraci pomocí jehly a injekční stříkačky, ale výtěžnost oocytů je až o 50 % vyšší a kumulus zůstane téměř nepoškozen (Dell'Aquila et al., 2001).



Obrázek 5. A) Folikul koňského ovária před izolací oocytu. **B)** Otevřený folikul pro izolaci oocytu, stěny folikulu musí být seškrabávány gynekologickou kyretou z důvodu pevného spoje oocytu ke stěně folikulu pomocí kumulárních buněk. Foto Mgr. Michal Dvořan, poskytnuto laboratoří Dr. Šušora.

2.2.1.2 Izolace oocytů pomocí ovum pick-up techniky

Ovum pick-up (OPU) je dnes velmi často využívanou metodou zisku oocytů, protože oocyty lze aspirovat ze živé klisny, ošetřené pouze lehkými sedativy, například detomidin hydrochloridem v kombinaci s epidurálním anestetikem 2% lidocainem (Lazzari et al., 2020). OPU lze provádět každých 10-14 dní bez hormonální stimulace, v případě potřeby i na březích klisnách. Nevýhodou jsou časová náročnost, pracnost a nízký výtěžek. OPU smí provádět pouze zkušený veterinář, jelikož se jedná o chirurgický zásah do živého zvířete. Mnoho zemí také vyžaduje etické prohlášení o zákroku (doc. Jiří Šichtař, osobní komunikace, 22. 2. 2024).

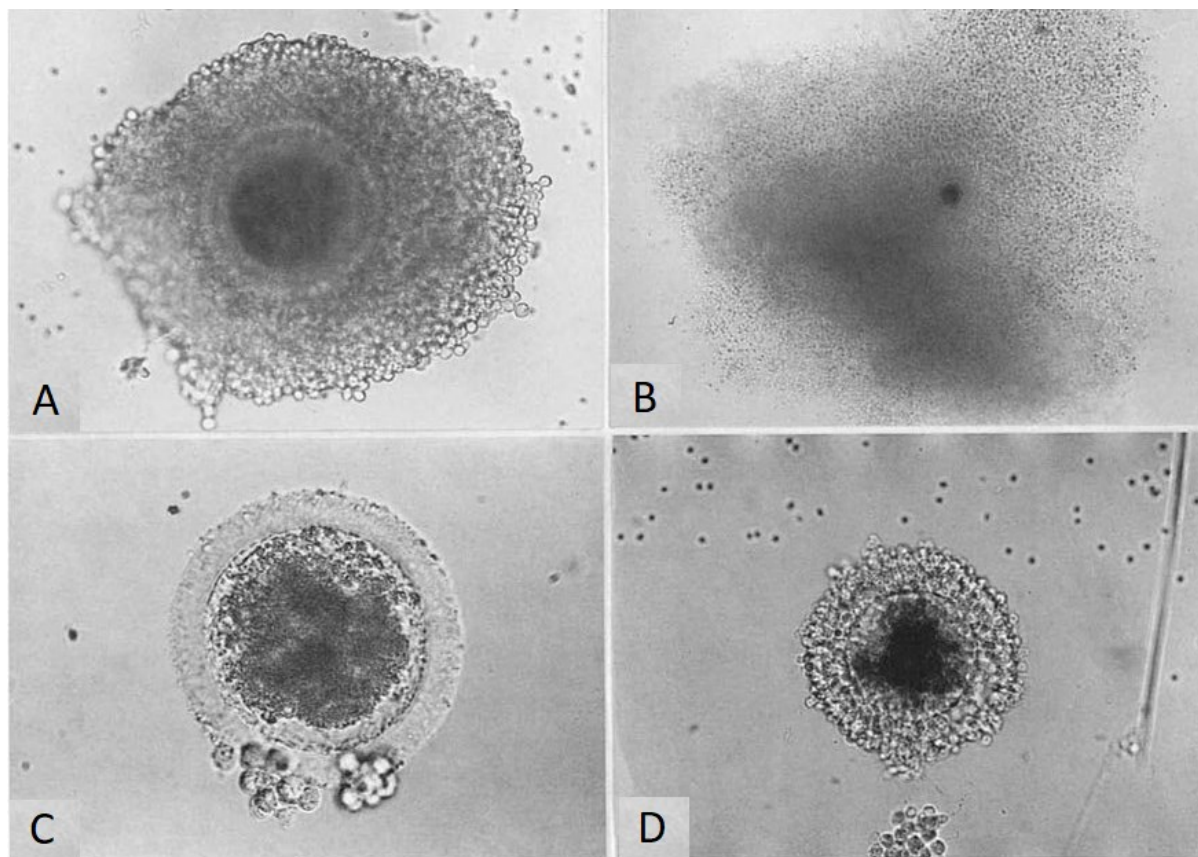
Před samotným OPU je klisna 1-3 dny sledována transrektálně pomocí ultrazvuku na přítomnost a velikost folikulů. OPU je provedeno, pokud je shledána přítomnost alespoň 8-10 folikulů na každém ováriu v rozmezí průměru folikulu 1 až 3,5 cm. I když se jedná o starší klisnu, která tuto podmínku často nesplňuje, je možné k aspiraci přistoupit s předpokladem nižší výtěžnosti oocytů. Nezralé oocyty jsou aspirovány pomocí dvouhroté jehly s průměrem 12 gauge, která je společně s ultrazvukovou sondou ukotvena v endovaginálním držáku (tvarem připomínající dlouhou pistoli). Po vniknutí jehly do folikulu je jeho stěna seškrabávána za současného výplachu OPU médiem. To se skládá z destilované vody, heparinu, fosfátem pufovaného fyziologického roztoku (PBS), BSA, penicilinu a streptomycinu (podle doc. Jiřího Šichtaře, osobní komunikace, 22. 2. 2024). Poté je veškerá tekutina z folikulu nasáta pomocí vakuové pumpy a aspirované oocyty jsou zachytávány na speciálním filtru. Tento proces je 8-10x opakován u každého folikulu. Získané oocyty jsou vloženy do holding média (viz strana 9) a transportovány do laboratoře pro jejich následnou *in vitro* maturaci (Lazzari et al., 2020).

2.2.2 *In vitro* maturace oocytů

IVM koňských oocytů je esenciálním krokem pro efektivní IVP embryí. IVM vede k vývoji zralého oocyty zastaveného v metafázi meiózy II, který je připraven k fertilizaci. IVM kultivační podmínky jsou zásadní pro získání většího množství vývojově kompetentních MII oocytů.

Izolované oocyty lze rozlišit podle morfologie kumulárních a granulózních buněk na kompaktní (Cp), expandované (Ex) a denudované (De) (Obrázek 6). Cp oocyty mají pevně soudržný obal složený z více než 4 vrstev kumulárních buněk kolem celého povrchu oocyty. Pokud jsou kumulární buňky přítomny jen na části povrchu oocyty, pak se jedná o částečně kompaktní kumulus. Ex oocyty mají kumulus na pohled značně rozestoupený oproti Cp, a De oocyty kolem sebe žádný kumulus nemají (Hinrichs, 1991) (Obrázek 6). Některé z izolovaných oocytů kolem sebe mohou mít pouze obal tvořený *coronou radiatou*, což je nejvnitřnější vrstva buněk kumulu těsně přilehlá k *zoně pellucidě*. Oproti bovinnímu modelu, kde Cp pocházejí z vývojově kompetentních folikulů a Ex z folikulů atretických, u koní mají

expandované oocyty až o 45 % vyšší maturační úspěšnost oproti oocytům s kompaktním kumulem (Hinrichs et al. 2005).



Obrázek 6: Morfologie koňských kumulus-oocyt komplexů. **A)** Oocyt s kompaktním (Cp) kumulem. **B)** Oocyt s expandovaným (Ex) kumulem. **C)** Denudovaný (De) degenerující oocyt. **D)** Oocyt s kompaktní coronou radiatou. Převzato od Goudet et al., 1997.

Získané oocyty se roztřídí podle výše uvedené morfologie (Cp, Ex, De). Obvykle se nechávají maturovat pouze Cp a Ex (Obrázek 6), které mají větší pravděpodobnost být vývojově kompetentní a nižší riziko degradace. Selektované oocyty je možné ihned nasadit do maturačního média a inkubovat požadovanou dobu. Alternativou je vložit oocyty do holdingového média (viz strana 9), ve kterém lze oocyty uchovat přes noc při teplotě 22°C, nebo až dva dny při teplotě 15°C (Felix et al., 2022). Výhodou holdingového média je pozastavení meiózy v profázi bez následného vlivu na meiotickou a vývojovou kompetenci oocytu. Navíc tento postup umožňuje plánování celého procesu *in vitro* fertilizace (Felix et al., 2022).

Na trhu je dostupných mnoho komerčně vyráběných IVM médií. Nejlepší výsledky má maturační médium složené z TCM-199 s Earle soli, 5 mU/ml bovinního folitropinu (FSH), 10 % FBS a 25 µg/ml gentamycinu. Standardní inkubační podmínky jsou normoxické při 38,2°C, 5% CO₂ po dobu 24-30 hodin pro Ex a 30-36 hodin pro Cp. Přibližně 42 % oocytů *in vitro* maturovaných v tomto médiu je po oplození vývojově kompetentních minimálně do stádia blastocysty (Hinrichs et al., 2005; Choi et al., 2007).

2.2.2.1 Vliv kumulárních buněk na *in vitro* maturaci

Během IVM je oocyt odkázán na metabolickou podporu kumulárních buněk, které ho obklopují. Na myším modelu bylo zjištěno, že kumulární buňky, mimo jiné, glykolyticky syntetizují pyruvát nejen pro potřeby vlastního energetického metabolismu, ale také pro oocyt, který jej pomocí oxidativní fosforylaci využívá pro produkci ATP v mitochondriích (Harris et al., 2009). Navzdory těmto poznatkům není u koňského oocyty detailně popsána dynamika energetického metabolismu, preferované substráty pro tvorbu ATP, či přesná funkce mitochondrií (Lewis et al., 2020).

Kumulární buňky nepodporují pouze metabolismus cukrů v oocyty, nýbrž také metabolismus purinů, lipidů, aminokyselin, cholesterolu a jiných steroidních látek. Dále kumulární buňky produkují v jisté míře látky jako vitronektin (VN), fibronektin (FN), komplement C3, alfa-2-makroglobulin (A2M) a antitrombin III, které se mohou potenciálně účastnit chemotaxe a interakce spermie-oocyt. Během IVM však dochází k poklesu exprese všech výše zmíněných proteinů oproti *in vivo* podmínkám. Přítomnost těchto proteinů v maturačních i fertilizačních médiích by v budoucnu mohla vést k lepším výsledkům koňského IVF (Walter et al., 2019).

2.3 *In vitro* fertilizace maturovaných oocytů kapacitovanými spermii

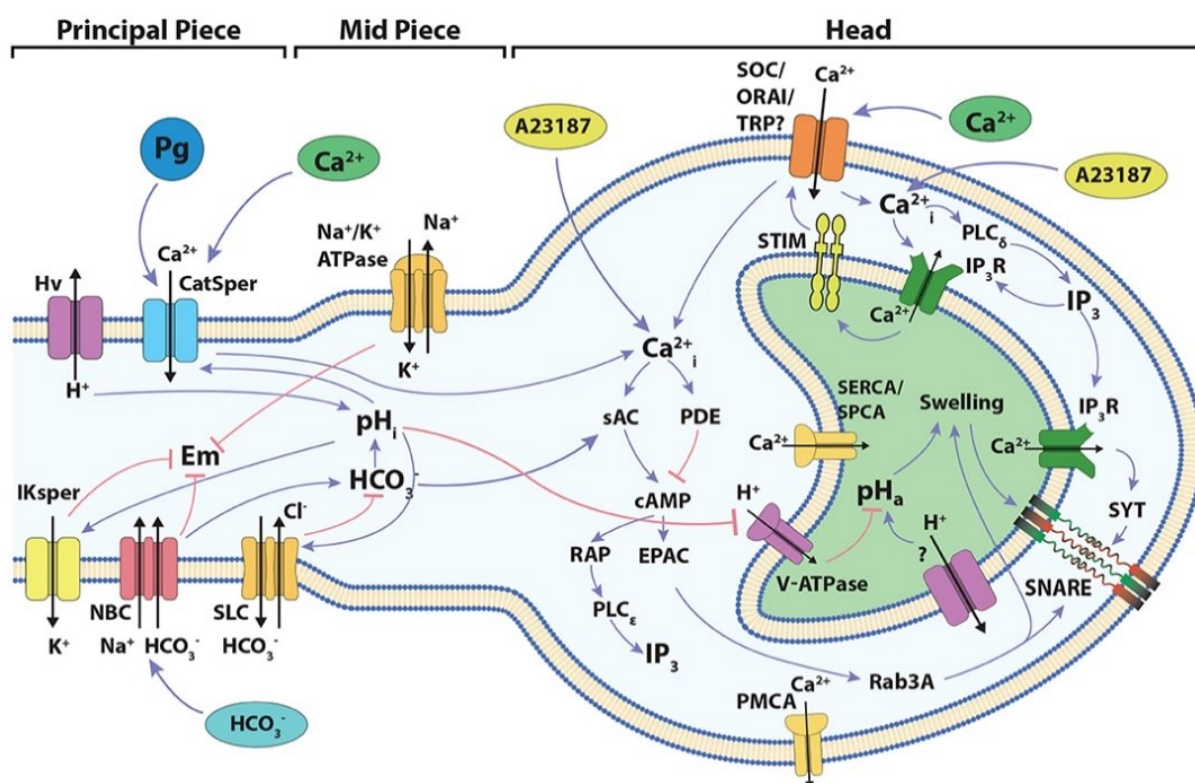
Pokud jsou zralé oocyty v MII fázi a spermie byly úspěšně kapacitovány, lze přistoupit ke společné kultivaci obou gamet ve fertilizačním médiu za specifických podmínek. Jak

přesný mechanismus, tak i molekulárně-biologická podstata oplození nejsou u koní detailně popsány. Předpokládá se, že hlavní principy oplození jsou stejné, či dosti podobné jako u jiných savců (Leemans et al., 2016).

Jak již bylo v této práci zmíněno dříve, hlavním úskalím IVF u koní je nedostatečná *in vitro* kapacitace. Felix et al. (2022) uvádí kapacitační podmínky, za kterých dojde k 90% fertilizaci (tvorbě pronukleů) s 74% vývojem blastocyst po IVF. Spermie je nejprve nutné 22 hodin preinkubovat v médiu obsahujícím PHE roztok (viz strana 3), přičemž dochází k jejich kapacitaci a jsou tak schopné uskutečnit akrozomální reakci a oocyt úspěšně oplodnit. Nejlepších výsledků bylo dosaženo po 3-hodinové koinkubaci gamet při 38,2°C, 5 % CO₂ a hypoxických podmínkách, t.j. 5 % O₂ a 90 % N₂ v FERT-TALP médiu, které obsahuje veškeré důležité živiny pro obě gamety (Felix et al., 2022).

Experimentální data dlouho poukazovala, že akrosomální reakce je u savců spuštěna vazbou galaktosyltransferázy (transmembránový protein hlavičky spermie) na *zona pellucida* glykoprotein 3 (ZP3). Jin et al. (2011) však na myším modelu dokázali, že k akrosomální reakci dochází už před vazbou na *zonu pellucidu*. Důležitou roli při tom hraje CatSper, což je esenciální iontový kanál specifický pro spermii (Obrázek 7). Propouští Ca²⁺ ionty, je pH a nízkonapěťově dependentní a umožňuje indukci hyperaktivace bičíku spermie, chemotaxi směrem k oocyту, spuštění kapacitačních dějů a následnou akrosomální reakci (Lishko et al., 2011). Vazba progesteronu na CatSper receptory v cytoplasmatické membráně spermie (Obrázek 7) způsobí vylití akrosomálních proteolytických enzymů, například hyaluronidázy, akrozinu, trypsinu a různých dalších proteáz, které hydrolyzují expandovaný kumulus i *zonu pellucidu*. Hydrolýza *zony pellucidy* pomocí aktivovaného akrozinu je následovaná fúzí plazmatických membrán obou gamet, což je zřejmě zajištěno povrchovým proteinem spermie PH-30 (Blobel et al., 1990). Další velmi důležitý protein účastnící se fúze je protein oolemy Juno, který rozeznává protein na membráně spermie IZUMO (Bianchi et al., 2014). Po fúzi dojde k influxu Na²⁺ iontů do oocyту a tím k depolarizaci membránového potenciálu, která trvá zhruba minutu, než dojde opětovné repolarizaci na klidových -80 mV. Tato depolarizace a repolarizace jsou jedním z obranných nástrojů oocyту proti polyspermii, protože spermie nejsou schopny fúzovat, pokud je membránový potenciál vyšší než -70 mV. Další obranou proti polyspermii může být funkce oocytárního proteinu Ubiquitin C-terminální hydrolázy-L1 (UCLH1), který je zodpovědný za uvolnění kortikálních granulí,

obsahující například peroxidázy, mukopolysacharidy, proteázy nebo hyalin, což způsobí kortikální reakci v *zoně pellucidě*, čímž dojde k blokaci dalších spermií (Šušor et al., 2010). Enzymy kortikálních granulí způsobí také změny v perivitelinních proteinech, zpevní vitelinní obálku, rozštěpí ZP2 a ZP3 glykoproteiny a tím znemožní vázaní dalších spermií. Glykosaminoglykany navazují do perivitelinního prostoru molekuly vody, čímž se prostor expanduje a vytvoří hyalinní vrstvu (Georgadaki et al., 2016). Posledním krokem je tvorba samčího a samičího pronukleu a jejich následná fúze. Samičí jádro dokončí meiózu II, vydělí se druhé pólové tělísko a dojde k formaci samičího pronukleu. Jádro spermie podstoupí řadu změn, jako například dekondenzaci chromatinu záměnou protaminů za histony nebo tvorbu nové jaderné obálky, čímž se vytvoří samčí pronukleus (Georgadaki et al., 2016). Po vzájemné migraci samčího a samičího pronukleu dojde k rozpadu jaderné membrány a vytvoření dělicího vřeténka, které předchází prvnímu mitotickému dělení. Následně dochází k dalším buněčným dělením takto vzniklého embrya (Schneider et al., 2021).



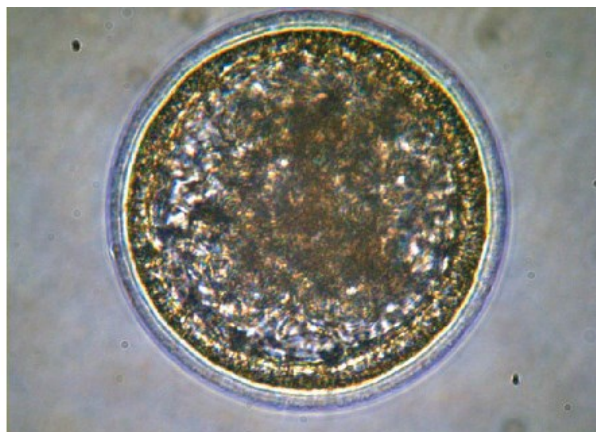
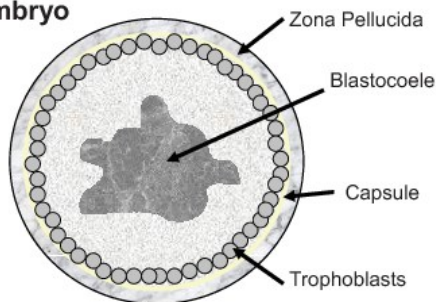
Obrázek 7. Schéma signálních drah, které vedou k akrosomální reakci u člověka. Progesteron aktivuje nepřímo přes lipidovou hydrolázu iontový kanál CatSper (Miller et al., 2016), což vede ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů a ke spuštění signálních drah vedoucích k akrosomální reakci. Převzato od Aldana et al., 2021.

2.4 Kultivace oplozeného oocyty do stadia blastocysty

Po koinkubaci gamet ve fertilizačním médiu se potenciálně oplozené oocyty přenesou do prekulivačního média, ve kterém jsou inkubovány 2 hodiny při 38,2°C, 5% CO₂ v hypoxické atmosféře. Po uplynutí této doby jsou odstraněny degradované oocyty. Zbýlé, neporušené oocyty jsou přeneseny do kulivačního média pro embrya, které se skládá pouze z DMEM/F-12 s 10 % FBS. Toto médium není nutné v průběhu kultivace vyměňovat na rozdíl od média pro kultivaci lidských embryí (taktéž použitelného pro kultivaci koňských embryí), kdy je po 5. dnu kultivace potřeba do média přidat 20 mM glukózy. Délka kultivace se liší v závislosti na plánování embryotransferu. Za 7 dní od fertilizace dochází k vytvoření časné blastocysty a za 10 dní jsou expandované blastocysty (Rader et al., 2016). Použití embryí je podrobněji prodiskutováno v následující kapitole o kryoprezervaci embryí. Podmínky kultivace je nutné nastavit tak, aby v inkubátoru bylo hypoxické prostředí s 5 % O₂. 5 % CO₂ zajistí, aby pH kulivačního média bylo zhruba 7,3. Zbytek atmosféry v inkubátoru, cca 90 %, je doplněn inertním plynem, většinou N₂. Embrya jsou kultivována pod parafínem v kapkách výše zmíněného kulivačního média o objemu 1 µl na 1 embryo, maximálně však 5 embryí pospolu v jedné kapce s odpovídajícím objemem kulivačního média. (Rader et al., 2016).

Po IVF dochází během *in vitro* kultivace embrya k mnoha změnám ve fyziologii a morfologii embrya. Zajímavým rozdílem u *in vitro* inkubovaných embryí oproti *in vivo* podmínkám je absence glykoproteinu kapsule. Kapsula (Obrázek 8) je viditelná cca od 6,5. dne a tvoří se ve chvíli, kdy embryo vstupuje do dělohy. Je formována buňkami trofoblastu a má ochrannou funkci. U embryí vytvořených *in vitro* se kapsula tvoří až po umělém přenosu embrya do dělohy příjemkyně (Bousquet et al., 1987).

Early Blastocyst Stage Embryo



Obrázek 8. Koňské embryo ve stádiu rané blastocysty s viditelným ochranným glykoproteinem kapsulou. Převzato od McCue et al., 2009.

2.5 Kryoprezervace koňských embryí

Pokud je získáno IVP embryo, jsou dvě možnosti, jak s ním naložit. Tou první je okamžitý přenos do předem hormonálně nasynchronizované příjemkyně. Management klisen-příjemkyň je velmi časově i finančně náročný, a proto je ve většině případů uchylováno ke druhé možnosti, kterou je kryoprezervace embrya. Ta umožní uskladnit embryo na téměř neomezenou dobu, embryo lze snadno transportovat například do místa transferu do příjemkyně, přičemž jej lze rozmrazit pouhých pár minut před samotným transferem.

Dnes se využívají dvě metody kryoprezervace embryí: pomalé mražení a vitrifikace. Pomalé mražení se odehrává v přístroji, kde je teplota média postupně snižována. Embryo je mraženo ve speciálním mrazícím médiu, které obsahuje glycerol. Embryo s médiem je přeneseno do 0,25ml pejety, uzavřeno a v prvním kroku zchlazeno z pokojové teploty na teplotu -6°C rychlostí 4°C za minutu. V druhém kroku je embryo drženo 15 minut při -6°C a následně zchlazeno na -35°C rychlostí $0,3^{\circ}\text{C}$ za minutu. Nakonec je pejeta s embryem přenesena do tekutého dusíku pro dlouhodobé uskladnění (Hudson et al., 2006). Při vitrifikaci je embryo s kryoprotektivním médiem šokově zamraženo v tekutém dusíku, aby se zabránilo tvorbě ledových krystalů, které by mohly embryo nevratně poškodit (Carnevale, 2006).

Pokud bude embryo kryokonzervováno, jeho průměr by neměl přesáhnout 300 μm , protože takové embryo má nízké množství blastocoelové tekutiny. Krystaly vytvořené z blastocoelové tekutiny mohou při kryokonzervaci poškodit okolní buňky a embryo by tak po rozmražení nebylo životaschopné (Campos-Chillón et al., 2009). Pokud je však z různých důvodů nutné kryokonzervovat expandované blastocysty (průměr 300-750 μm), lze toto provést propíchnutím zony *pellucidy* a následnou biopsií buněk trofoblastu pomocí mikromanipulátoru, což způsobí kolaps blastocysty, při které je obsah blastocoelové dutiny “vypuštěn” do prostoru s 46% úspěšností přežití embrya po rozmražení (Choi et al., 2011).

2.6 Embryotransfer

Celý proces IVF je uzavřen přenosem IVP embrya do klisny-příjemkyně. Díky kryoprezervaci raných blastocyst se dá přenos embrya přesně naplánovat podle estrálního cyklu příjemkyně. Příjemkyně musí splňovat přísná kritéria, aby došlo k úspěšnému uchycení a následnému vývoji embrya. Před přenosem by měla být vyhodnocena kvalita estrálního cyklu (dynamika folikulárního růstu, průměr folikulu při ovulaci, indikace ovulace, tvorba normálního žlutého tělíska 5 dní po ovulaci, či známka edému v děloze). Dále také závisí na věku příjemkyně a na podané medikaci v den přenosu. Nejvhodnější příjemkyně jsou 2-12ti leté klisny, kterým jsou v den přenosu podány antimikrobiální, protizánětlivé a antikřečové léky (Blanco et al., 2023). Závěrečné vyšetření je vždy provedeno těsně před přenosem.

Pokud technik zjistí, že klisna je zdravotně v pořádku, splňuje veškeré výše uvedené podmínky a majitel klisny má připraveno vhodné embryo, je možné provést embryotransfer. Ten se zpravidla provádí 8-9 dní po ovulaci příjemkyně, kdy žluté tělísko produkuje velké množství progesteronu, který je pro uchycení a následný nitroděložní vývoj embrya esenciální. Sterilní katetr je transvaginálně zaveden přes děložní krček do děložního rohu a embryo je následně přeneseno tlakem způsobeným injekční stříkačkou připevněnou na opačný konec katetru. Příjemkyně by se měla po transferu vyhnout jakémukoliv stresu, který by mohl přispět ke vstřebání plodu. Ultrazvukové vyšetření březosti je provedeno zhruba týden po přenosu, což odpovídá stáří embrya 11-14 dní po oplození. V tuto dobu je již viditelný embryonální váček, což potvrzuje březost (McCue a Squires, 2015).

3 Výhody a nevýhody konvenčního IVF oproti ICSI

V lidské medicíně se obvykle používají obě metody umělého oplodnění, konvenční IVF i ICSI, a jejich použití je determinováno diagnózou konkrétního páru. ICSI je oproti konvenčnímu IVF nesporně finančně i časově náročnější metodou, protože je zapotřebí práce na mikromanipulátoru, která vyžaduje expertízu pracovníka. Náklady na koupi a provoz mikromanipulátoru jsou rovněž nemalé a proto je ICSI použito jen v nezbytně nutných případech, kdy nelze aplikovat konvenční IVF. Pro páry, kde muž trpí nedostatkem kvalitních progresivně motilních spermií, kvůli čemuž je konvenční IVF vyloučeno, je ICSI naopak poslední záchranou, jelikož pro potřeby oplození pomocí ICSI postačuje teoreticky jediná živá spermie, která je vpíchnuta do ooplasmu oocyту a umožňuje tak jinak obtížnou fertilizaci.

U koní je situace naprosto odlišná. ICSI bylo donedávna jedinou možností, jak v klinických programech získat embryo *in vitro*. Felix et al. (2022) sice publikovali první funkční IVF protokol, nicméně k úplnému pochopení kapacitačních a fertilizačních dějů je třeba dalšího výzkumu. Dalším důvodem, proč je ICSI u koní tak rozšířenou technikou, je obrovský zájem o chov koní pro sport a množství finančních investic, které jsou do toho vkládány. Koně, na rozdíl od člověka, lze legálně šlechtit a majitelé mohou ovlivňovat to, jaký genetický materiál ponese jejich hříbě. Ve sportu jsou nejúspěšnější koně nejvíce žádaní a vzácní, tudíž jediným způsobem, jak získat jejich genetický materiál do svého stáda, je získání jejich gamet asistovanou reprodukcí. Prodej oocytů klisen není běžnou praxí z důvodu náročnosti jejich získání, omezeného množství a problematického uchovávání. U hřebců je situace naprosto opačná a obchod se semenem probíhá celosvětově. Každý se snaží s draze nakoupeným semenem šetřit, a ICSI je pro tyto případy naprosto vhodným nástrojem, jak minimalizovat spotřebu spermií.

Zavedení konvenčního IVF do koňské IVP embryí zcela jistě nenahradí metodu ICSI, pouze nabídne výrazně levnější alternativu, jak získat embryo. Sám klient si bude moci vybrat, jak bude jeho embryo vyrobeno a cena se bude odvíjet od náročnosti práce, nutnosti vybavení a především kvality genetického materiálu, na kterém se pracuje.

Závěr

U hospodářských zvířat, především u skotu, je IVP embryí pomocí IVF více než čtyřnásobně vyšší než klasická *in vivo* produkce embryí a jejich následný výplach z dělohy. U koní je rozdíl v Severní Americe trojnásobně větší, v Evropě je rozdíl dokonce 65 krát větší ve prospěch IVP embryí a dá se očekávat, že podíl *in vitro* a *in vivo* produkováných embryí bude každým rokem narůstat (Viana, 2023). Z toho se dá vyvodit, že chovatelé mají o IVP embryí velký zájem a IVF bude nabírat na významu nejen v komerční sféře. Proto bude důležité celý IVF protokol zefektivnit pomocí výzkumu a popisu základních procesů, které probíhají *in vivo*.

Jedním z možných směrů, kterými by se mohlo IVF ubírat, je zkoumání možností genetického inženýrství u koní. To by mohlo zahrnovat manipulaci s geny pro zlepšení specifických vlastností koní, jako je výkon, zdraví či odolnost vůči nemocem. Dalším potenciálním směrem je spojení IVF s moderními technologiemi jako je CRISPR/Cas9, což by umožnilo přesné úpravy genů koňských embryí. Tato technologie by mohla být využita k eliminaci genetických vad nebo dokonce k vytvoření geneticky modifikovaných koní s požadovanými vlastnostmi. Jelikož je koňský sport, ať už drezura, parkur, pólo či dostihy, velmi dobře financovaný, tyto techniky se mohou velmi brzy stát realitou a velmi pravděpodobně se najdou tací lidé, kteří si tyto služby zaplatí.

Celkově lze tedy konstatovat, že IVF u koní představuje důležitý pokrok v oblasti reprodukční biologie a chovu koní. I přes stávající výzvy a omezení je potenciál IVF pro chov koní nezpochybnitelný. S dalším výzkumem a technologickými inovacemi může IVF nadále hrát klíčovou roli ve zlepšování genetické kvality a udržitelnosti populací koní po celém světě.

Seznam použité literatury

- Aldana, A., Carneiro, J., Martínez-Mekler, G., & Darszon, A. (2021). Discrete Dynamic Model of the Mammalian Sperm Acrosome Reaction: The Influence of Acrosomal pH and Physiological Heterogeneity. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.682790>
- Alm, H., Torner, H., Steffen Blottner, Gerd Nürnberg, & Kanitz, W. (2001). Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. *Theriogenology*, 56(5), 817–829. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00610-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00610-0)
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., & Ramires Neto, C. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(3), 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003>
- Ambruosi, B., Gianluca Accogli, Douet, C., Canépa, S., Pascal, G., Philippe Monget, Moros-Nicolás, C., Uffe Holmskov, Mollenhauer, J., Robbe-Masselot, C., Vidal, O., Desantis, S., & Ghylène Goudet. (2013). Deleted in malignant brain tumor 1 is secreted in the oviduct and involved in the mechanism of fertilization in equine and porcine species. *Reproduction*, 146(2), 119–133. <https://doi.org/10.1530/rep-13-0007>
- Baena, V., & Terasaki, M. (2019). Three-dimensional organization of transzonal projections and other cytoplasmic extensions in the mouse ovarian follicle. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37766-2>
- *Benammar, A., Derisoud, E., Vialard, F., Palmer, E., Ayoubi, J. M., Poulain, M., & Chavatte-Palmer, P. (2021). The Mare: A Pertinent Model for Human Assisted Reproductive Technologies? *Animals*, 11(8), 2304. <https://doi.org/10.3390/ani11082304>

- Bézar, J. (1992). In vitro fertilization in the mare. Proceedings of the International Scientific Conference on Biotechnics in Horse Reproduction. *Agricultural University of Crakow, Poland Abstract 12*.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., & Wright, G. J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, *508*(7497), 483–487.
<https://doi.org/10.1038/nature13203>
- Blanco, M., Foss, R., Tönißen, A., Rohn, K., Burger, D., & Harald Sieme. (2023). Age and treatment on the day of embryo transfer in recipient mares affect likelihood of pregnancy. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe Grosstiere, Nutztiere*, *51*(06), 358–366.
<https://doi.org/10.1055/a-2186-2693>
- Blobel, C. P., Myles, D. G., Primakoff, P., & White, J. M. (1990). Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. *Journal of Cell Biology*, *111*(1), 69–78.
<https://doi.org/10.1083/jcb.111.1.69>
- Bousquet, D., Guillomot, M., & Betteridge, K. J. (1987). Equine zona pellucida and capsule: Some physicochemical and antigenic properties. *Gamete Research*, *16*(2), 121–132.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1120160204>
- Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. L. (2011). Semen Preservation. *Manual of Equine Reproduction*, 207–227. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-06482-8.00023-5>
- Campos-Chillón, L. F., Suh, T. K., Barcelo-Fimbres, M., Seidel, G. E., & Carnevale, E. M. (2009). Vitriification of early-stage bovine and equine embryos. *Theriogenology*, *71*(2), 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.001>

- *Carnevale, E. M. (2006). Vitrification of Equine Embryos. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 22(3), 831–841.
<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2006.08.003>
- Carnevale, E. M., Maclellan, L. J., Coutinho, M. A., & Squires, E. L. (2003). Pregnancies attained after collection and transfer of oocytes from ovaries of five euthanatized mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(1), 60–62.
<https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.60>
- Choi, Y. H., Love, L. B., Varner, D. D., & Hinrichs, K. (2006). Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: Effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 66(4), 955–963. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.064>
- Choi, Y. H., Love, L. B., Varner, D. D., & Hinrichs, K. (2007). Effect of holding technique and culture drop size in individual or group culture on blastocyst development after ICSI of equine oocytes with low meiotic competence. *Animal Reproduction Science*, 102(1-2), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.028>
- Choi, Y. H., Velez, I. C., Riera, F. L., Roldán, J. E., Hartman, D. L., Bliss, S. B., Blanchard, T. L., Hayden, S. S., & Hinrichs, K. (2011). Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology*, 76(1), 143–152.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.028>
- Choi, Y., Love, C., Love, L., Varner, D., Brinsko, S., & Hinrichs, K. (2002). Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction*, 123(3), 455–465. <https://doi.org/113>

- Choi, Y.-H., Velez, I. C., Macías-García, B., Riera, F. L., Ballard, C. S., & Hinrichs, K. (2016). Effect of clinically-related factors on in vitro blastocyst development after equine ICSI. *Theriogenology*, *85*(7), 1289–1296.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.015>
- Dell'Aqua, J. A., Papa, F. O., Alvarenga, M. A., & Zahn, F. S. (2001). Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *Animal Reproduction Science*, *68*, 324-325.
- Dell'Aquila, M. E., Fusco, S., Lacalandra, G. M., & Maritato, F. (1996). In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology*, *45*(3), 547–560. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00402-t](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00402-t)
- Dell'Aquila, M. E., Masterson, M., Maritato, F., & Hinrichs, K. (2001). Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of equine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, *60*(1), 79–88.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1064>
- Felix, M., Turner, R. M., Dobbie, T., & Hinrichs, K. (2022). Successful in vitro fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation. *Biology of Reproduction*, *107*(6), 1551–1564.
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioac172>
- Florman, H. M., Jungnickel, M. K., & Sutton, K. A. (2007). What can we learn about fertilization from cystic fibrosis? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(27), 11123–11124.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0703626104>

- *Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4), 979–986.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2723>
- Goudet, G., Bézard, J., Duchamp, G., Gérard, N., & Palmer, E. (1997). Equine Oocyte Competence for Nuclear and Cytoplasmic in Vitro Maturation: Effect of Follicle Size and Hormonal Environment1. *Biology of Reproduction*, 57(2), 232–245.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod57.2.232>
- Harayama, H., Noda, T., Ishikawa, S., & Osamu Shidara. (2012). Relationship between cyclic AMP-dependent protein tyrosine phosphorylation and extracellular calcium during hyperactivation of boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 79(10), 727–739. <https://doi.org/10.1002/mrd.22106>
- Harris, S. E., Leese, H. J., Gosden, R. G., & Picton, H. M. (2009). Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 76(3), 231–238. <https://doi.org/10.1002/mrd.20945>
- Hawley, L. R., Enders, A. C., & Hinrichs, K. (1995). Comparison of Equine and Bovine Oocyte-Cumulus Morphology within the Ovarian Follicle. *Biology of Reproduction*, 52, 243–252. https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.243
- Hidalgo, M., Consuegra, C., Dorado, J., M. Diaz-Jimenez, Ortiz, I., Pereira, B., Sanchez, R., & Crespo, F. (2018). Concentrations of non-permeable cryoprotectants and equilibration temperatures are key factors for stallion sperm vitrification success. *Animal Reproduction Science*, 196, 91–98.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.022>

- Hillman, R. B., Olar, T. T., Squires, E. L., & Pickett, B. W. (1980). Temperature of the artificial vagina and its effect on seminal quality and behavioral characteristics of stallions. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177(8), 720–722.
- Hinrichs, K. (1991). The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare. *Theriogenology*, 36(2), 157–168.
[https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90375-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90375-n)
- Hinrichs, K., Choi, Y. H., Love, L. B., Varner, D. D., Love, C. C., & B.E. Walckenaer. (2005). Chromatin Configuration Within the Germinal Vesicle of Horse Oocytes: Changes Post Mortem and Relationship to Meiotic and Developmental Competence¹. *Biology of Reproduction*, 72(5), 1142–1150. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036012>
- Hinrichs, K., Love, C. C., Brinsko, S. P., Choi, Y. H., & Varner, D. D. (2002). In Vitro Fertilization of In Vitro-Matured Equine Oocytes: Effect of Maturation Medium, Duration of Maturation, and Sperm Calcium Ionophore Treatment, and Comparison with Rates of Fertilization In Vivo after Oviductal Transfer¹. *Biology of Reproduction*, 67(1), 256–262. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.1.256>
- Hong, C., Chiang, B., Ku, J., Wei, Y., & Fong, J. (1985). Calcium antagonists stimulate sperm motility in ejaculated human semen. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 19(1), 45–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1985.tb02611.x>
- Hudson, J., McCue, P. M., Carnevale, E. M., Welch, S., & Squires, E. L. (2006). The effects of cooling and vitrification of embryos from mares treated with equine follicle-stimulating hormone on pregnancy rates after nonsurgical transfer. *Journal of Equine Veterinary Science*, 26(2), 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2005.11.012>
- Jasko, D. J. (1992). Evaluation of Stallion Semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 8(1), 129–148. [https://doi.org/10.1016/s0749-0739\(17\)30471-6](https://doi.org/10.1016/s0749-0739(17)30471-6)

- *Jin, S.-K., & Yang, W.-X. (2016). Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget*, 8(2), 3600–3627. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12274>
- *Juan Carlos Gardón, & K. Satué. (2023). History of the horses and biotechnologies applied to its reproduction. *IntechOpen EBooks*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.1001925>
- Kimura, Y., & Yanagimachi, R. (1995). Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biology of Reproduction*, 52(4), 709–720. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.4.709>
- Lange Consiglio A., & Cremonesi F. (2012). Hyperactivation of stallion sperm in follicular fluid for in vitro fertilization of equine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 193–194.
- Lazzari, G., Colleoni, S., Crotti, G., Turini, P., Fiorini, G., Barandalla, M., Landriscina, L., Dolci, G., Benedetti, M., Duchi, R., & Galli, C. (2020). Laboratory Production of Equine Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89.
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103097>
- *Leemans, B., Gadella, B. M., Stout, T. A. E., De Schauwer, C., Nelis, H., Hoogewijs, M., & Van Soom, A. (2016). Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction*, 152(6), 233–245. <https://doi.org/10.1530/rep-16-0420>
- Lewis, N., Hinrichs, K., Leese, H. J., Caroline McG. Argo, Brison, D. R., & Sturmey, R. G. (2020). Energy metabolism of the equine cumulus oocyte complex during in vitro maturation. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60624-z>
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387–391.
<https://doi.org/10.1038/nature09767>

- Love, C. C. (1992). Semen Collection Techniques. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 8(1), 111–128. [https://doi.org/10.1016/s0749-0739\(17\)30470-4](https://doi.org/10.1016/s0749-0739(17)30470-4)
- Macedo, S., Bliebernicht, M., Carvalheira, J., Costa, A., Ribeiro, F., & Rocha, A. (2018). Effects of two freezing methods and two cryopreservation media on post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(2), 519–524. <https://doi.org/10.1111/rda.13140>
- Marco Antonio Alvarenga, Papa, F. O., Carmo, M. T., Tathiane Kievitsbosch, Manoela, M., & Carlos Ramires Neto. (2012). Methods of Concentrating Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(8), 424–429. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.003>
- McCue P., DeLuca C., Ferris R., & Wall J. (2009). How to Evaluate Equine Embryos. *Proceedings of the ... Annual Convention - American Association of Equine Practitioners.*, 55, 252–256.
- McCue, P. M., & Squires, E. L. (2015). *Equine Embryo Transfer*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18123>
- Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., Hill, R. Z., Bautista, D. M., Kirichok, Y., & Lishko, P. V. (2016). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science*. 352(6285), 555–559. <https://doi.org/10.1126/science.aad6887>

- Mugnier, S., Kervella, M., Douet, C., Canepa, S., Pascal, G., Deleuze, S., Duchamp, G., Monget, P., & Goudet, G. (2009). The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine in vitro fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-129>
- Noue, P., Bernabé, J., Rampin, O., Vidament, M., Dumas, T., Palmer, E., & Magistrini, M. (2001). Sexual behavior of stallions during in-hand natural service and semen collection: an observation in French studs. *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), 161–169. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00153-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00153-1)
- Palmer, E., J Bézard, M Magistrini, & Duchamp, G. (1991). In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *HAL (Le Centre Pour La Communication Scientifique Directe)*, 44, 375–384.
- Rader, K., Choi, Y.-H., & Hinrichs, K. (2016). Intracytoplasmic Sperm Injection, Embryo Culture, and Transfer of In Vitro–Produced Blastocysts. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(3), 401–413.
<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.003>
- Rathi, R., Colenbrander, B., Stout, T. A. E., Bevers, M. M., & Gadella, B. M. (2002). Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Molecular Reproduction and Development*, 64(1), 120–128. <https://doi.org/10.1002/mrd.10216>
- Ribeiro, B. I., Love, L. B., Choi, Y. H., & Hinrichs, K. (2008). Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, 108(1-2), 171–179.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.08.001>

- Sampaio, B., Ortiz, I., Resende, H., Felix, M., Varner, D., & Hinrichs, K. (2021). Factors affecting intracellular calcium influx in response to calcium ionophore A23187 in equine sperm. *Andrology (Print)*, 9(5), 1631–1651.
<https://doi.org/10.1111/andr.13036>
- Schneider, I., de Ruijter-Villani M., Hossain J. M., Stout, T. A. E., & Ellenberg, J. (2021). Dual spindles assemble in bovine zygotes despite the presence of paternal centrosomes. *Journal of Cell Biology*, 220(11).
<https://doi.org/10.1083/jcb.202010106>
- Squires, E. L., Wilson, J. M., Kato, H., & Blaszczyk, A. (1996). A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 45(1), 306. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)84779-0](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)84779-0)
- Suarez, S. S., Vincenti, L., & Ceglia, M. W. (1987). Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *Journal of Experimental Zoology*, 244(2), 331–336. <https://doi.org/10.1002/jez.1402440218>
- Susor, A., Liskova, L., Toralova T., Pavlok A., Pivonkova K., Karabinova P., Lopatarova M., Sutovsky, P., & Kubelka, M. (2010). Role of Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1 in Antipolyspermy Defense of Mammalian Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 82(6), 1151–1161. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081547>
- Tremoleda, J. L., Gadella, B. M., Stout, T. A. E., Colenbrander, B., & Bevers, M. M. (2003). Evaluation of sperm-oocyte interaction during in vitro fertilization in the horse. *In Vitro Production of Horse Embryos: Fundamental Aspects*, 67-91.

- Tsai, P.-S. J., Ian Andrew Brewis, Jillis van Maaren, & Gadella, B. M. (2012). Involvement of Complexin 2 in Docking, Locking and Unlocking of Different SNARE Complexes during Sperm Capacitation and Induced Acrosomal Exocytosis. *PLOS ONE*, 7(3), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032603>
- van Gestel, R. A., Brewis, I. A., Ashton, P. R., Brouwers, J. F., & Gadella, B. M. (2007). Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 13(7), 445–454. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam030>
- Viana, J. H. M. (2023). 2022 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals The main trends for the world embryo industry still stand. *Embryo Technology Newsletter*. https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2022.pdf
- Walter, J., Huwiler, F., Fortes, C., Grossmann, J., Roschitzki, B., Hu, J., Naegeli, H., Laczko, E., & Bleul, U. (2019). Analysis of the equine “cumulome” reveals major metabolic aberrations after maturation in vitro. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5836-5>
- Yanagimachi, R. (1975). Acceleration of the Acrosome Reaction and Activation of Guinea Pig Spermatozoa by Detergents and Other Reagents. *Biology of Reproduction*, 13(5), 519–526. <https://doi.org/10.1095/biolreprod13.5.519>
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, 2(4), 371–372. <https://doi.org/10.1017/s0967199400002240>